

51

Int. Cl. 2:

C 07 C 103-52

19 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DT 25 09 783 A1

11

# Offenlegungsschrift 25 09 783

21

Aktenzeichen: P 25 09 783.0

22

Anmeldetag: 6. 3. 75

23

Offenlegungstag: 11. 9. 75

30

Unionspriorität:

32 33 31

8. 3. 74 Japan 27442-74

54

Bezeichnung:

Decapeptidamide

71

Anmelder:

Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka (Japan)

74

Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; Meyer, Th., Dr.-Ing.; Eishold, K.W., Dr.-Ing.;  
Fues, J.F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Kreisler, A. von, Dipl.-Chem.;  
Keller, J.C., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Pat.-Anwälte,  
5000 Köln u. 6232 Bad Soden

72

Erfinder:

Fujino, Masahiko, Takarazuka, Hyogo; Fukuda, Tsunehiko, Suita;  
Shinagawa, Susumu, Higashi; Osaka (Japan)

DR.-ING. VON KREISLER DR.-ING. SCHÖNWALD  
DR.-ING. TH. MEYER DR. FUES DIPL.-CHEM. ALIK VON KREISLER  
DIPL.-CHEM. CAROLA KELLER ~~XXXXXXXXXXXX~~ DIPL.-ING. SELTING

5 KÖLN 1, DEICHMANNHAUS

Köln, den 5.3.75

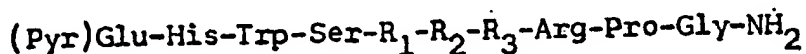
AvK/IM

2509783

Takeda Chemical Industries, Ltd., 27, Doshomachi 2-chome,  
Higashi-ku, Osaka /Japan

Decapeptidamide

Die Erfindung betrifft neue Decapeptidamidderivate mit  
starker ovulationsinduzierender Wirkung der Formel



(I)

worin  $\text{R}_1$  Tyr oder Phe,  $\text{R}_2$  D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser,  
D-Thr oder D-Met und  $\text{R}_3$  Leu, Ile oder Nle bedeuten.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung  
der Decapeptidamidderivate der Formel (I).

In der Beschreibung und den Patentansprüchen sind Amino-  
säuren und Peptide und ihre aktivierten Carboxyl- oder Schutz-  
gruppen mit Abkürzungen bezeichnet, wie sie entweder auf dem  
betreffenden Fachgebiet gebräuchlich sind oder vom Committee  
on Biochemical Nomenclature IUPAC-IUB vorgeschlagen wurden.  
Wenn nicht anders angeführt ist, weisen die Aminosäuren L-  
Konfiguration auf.

Folgende Abkürzungen wurden beispielsweise verwendet:

Abu:  $\alpha$ -Aminobuttersäure

Arg: Arginin

BOC: tert-Butoxycarbonyl

Bzl: Benzyl

DCC: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid

Gly: Glycin

His: Histidin

HONB: N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid

Ile: Isoleucin

Leu: Leucin

Nle: Norleucin

Nva: Norvalin

Met: Methionin

509837/0963

- 2 -

OM : M thylester  
OBzl: Benzylester  
ONB: N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximidester  
OSu: N-Hydroxysuccinimidester  
Phe: Phenylalanin  
Pro: Prolin  
(Pyr)Glu: Pyroglutaminsäure  
Ser: Serin  
Thr: Threonin  
Tos: Tosyl  
Trp: Tryptophan  
Tyr: Tyrosin

Es ist seit Jahren bekannt, daß der Hypothalamus Faktoren enthält, welche auf höherer Ebene die Sekretion tropischer Hormone aus der Hypophyse regeln.

Nach der Isolation eines Thyrotropin freisetzenden Hormons (TRH), wurde ein Hormon, das luteinisierende Hormone freisetzt (LH-RH), in reiner Form aus Schweinen und Schafen extrahiert und als ein Decapeptid der folgenden Struktur identifiziert: (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>. (A.V. Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 1334 (1971); R.Guillemin et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 69, 278 (1972)]. Auf diese Erkenntnis folgte die Herstellung einer Anzahl ähnlicher Peptide, mit den analogen Peptiden wurden auch biologische Tests durchgeführt. Da jedoch die physiologische Wirksamkeit des Peptids selbst durch geringfügige Modifikationen in der oben angeführten Aminosäurezusammensetzung stark beeinträchtigt wird, muß die oben angeführte chemische Struktur als wesentlich für die Erzielung der maximalen physiologischen Wirksamkeit angesehen werden.

(A.V.Schally et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 4, 366 (1972)].

- 2 -

509837/0963

- 3.

Kürzlich veröffentlichten Monahan et al in "Biochemistry", Band 12, Nr. 23, Seiten 4616-4620 (1973), daß unter den von ihnen hergestellten LH-RH-Analogen wie z.B.  $[Ala^6]_{LH-RH}$ ,  $[D-Ala^6]_{LH-RH}$ ,  $[Val^6]_{LH-RH}$ ,  $[D-Val^6]_{LH-RH}$ ,  $[Pro^6]_{LH-RH}$  und  $[D-Pro^6]_{LH-RH}$  jene der Formel  $[D-Ala^6]_{LH-RH}$  die stärkste Wirksamkeit aufweist, nämlich 350 - 450 % der Wirksamkeit der Stamm-LH-RH-Verbindung. Die Literatur lehrt weiters, daß LH-RH-Analoga, die in Stellung 6 eine D-Aminosäure mit einer größeren Anzahl von Seitenketten aufweisen, als D-Ala, weniger wirksam sind als das Stammhormon. Trotz des oben angeführten Standes der Technik ist es gelungen, Polypeptide der Formel (I), in welchen die D-Aminosäure in Stellung 6 eine größere Anzahl von Seitenketten aufweist als D-Ala, herzustellen und auf ihre LH-RH-Wirksamkeit zu testen. Dabei wurde überraschend gefunden, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide der Formel (I) um wenigstens 1000 % wirkungsvoller sind als ihre Stamm-LH-RH-Hormone. Die vorliegende Erfindung beruht auf diesen Erkenntnissen.

Hauptziel der Erfindung ist daher die Bereitstellung von neuen Decapeptidamidderivaten der Formel (I) und starker ovulationsinduzierender Wirksamkeit.

Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung der Decapeptidamidderivate der Formel (I).

Das Decapeptidamidderivat der Formel (I) wird nach einem Verfahren hergestellt, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Reaktant (A) --- L-Pyroglutaminsäure oder ein Peptidfragment, das eine N-endständige L-Pyroglutaminsäureeinheit (d.h. (Pyr)-Glu) und gleichzeitig von dort an die oben angeführte Aminosäuresequenz aufweist --- mit einem Reaktanten (B) --- einer Aminkomponente, welche dem Rest des Decapeptidamidderivates der Formel (I) entspricht --- kondensiert wird, wo-

- 4 -

b i die beiden Reaktanten gegebenenfalls durch eine oder mehrere Schutzgruppen geschützt sind, welche dann entfernt werden.

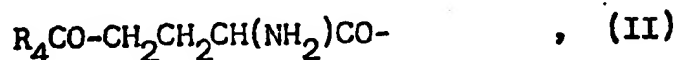
Der Reaktant (A) ist daher L-Pyroglutaminsäure oder ein Peptidfragment, das eine N-endständige L-Pyroglutaminsäure aufweist und gleichzeitig von dort an die Aminosäuresequenz der Formel (I) besitzt. Der mit dem Reaktanten (A) zu kondensierende Reaktant (B) ist eine Aminkomponente, welche dem Rest des Decapeptidamidderivates der Formel (I) entspricht, wobei die Reaktanten (A) und (B) gegebenenfalls geschützt sind.

Grundlegende Kombinationsmöglichkeiten der Reaktanten (A) und (B) sind aus der nachstehenden Tabelle 1 ersichtlich.

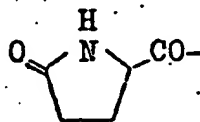
- 5 -  
Tabelle 1

Reaktant Kombina- tion	(A)	(B)
1	(Pyr)Glu-OH	H-His-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> - R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
2	(Pyr)Glu-His-OH	H-Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> - Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
3	(Pyr)Glu-His- Trp-OH	H-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg- Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
4	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-OH	H-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro- Gly-NH <sub>2</sub>
5	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R <sub>1</sub> -OH	H-R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg-Pro- Gly-NH <sub>2</sub>
6	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -OH	H-R <sub>3</sub> -Arg-Pro-Gly- NH <sub>2</sub>
7	(Pyr)Glu-His- Trp-Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> - R <sub>3</sub> -OH	H-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
8	(Pyr)Glu-His-Trp- Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg- OH	H-Pro-Gly-NH <sub>2</sub>
9	(Pyr)Glu-His-Trp- Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg- Pro-OH	H-Gly-NH <sub>2</sub>
10	(Pyr)Glu-His-Trp- Ser-R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -Arg- Pro-Gly-OH	NH <sub>3</sub>

- 6 -  
Es ist auch bekannt, daß eine geschützte L-Glutamyl-  
gruppe der allgemeinen Formel (II)



worin  $R_4$  eine Alkoxygruppe wie z.B. Methoxy, Äthoxy, n-Propoxy, iso-Propoxy, n-Butoxy od.dgl., eine Aralkyloxy-  
gruppe wie z.B. Benzyloxy od.dgl., oder Amin bedeutet, leicht  
in die L-Pyroglutamylgruppe der Formel



durch in Kontaktbringen mit einer Base wie z.B. Ammoniak  
u.dgl. oder einer Säure wie z.B. Essigsäure od.dgl. umge-  
wandelt werden kann und daß die Gruppe der Formel (II) in  
dieser Hinsicht der L-Pyroglutamylgruppe selbst äquivalent  
ist. Das erfindungsgemäße Verfahren ist auf der Annahme auf-  
gebaut, daß das L-Pyroglutamyl (d.h.: (Pyr)Glu-) des Reaktan-  
ten (A) nicht nur die L-Pyroglutamylgruppe selbst, sondern  
auch die geschützte L-Glutamylgruppe der Formel (II) ein-  
schließt. Wenn das (Pyr)Glu- des Reaktanten (A) die Gruppe  
(II) darstellt, kann die Gruppe (II) leicht nach an sich be-  
kannten Verfahren in die L-Pyroglutamylgruppe selbst umgewan-  
delt werden.

Die erfindungsgemäße Kondensationsreaktion kann nach  
für die Herstellung von Peptidbindungen bekannten Verfahren  
durchgeführt werden. Beispiele für solche Kondensations-  
verfahren sind das DCC/HONB-Verfahren (BE-PS 796.399), das  
Azidverfahren, das Chloridverfahren, das Säureanhydridver-  
fahren, das gemischte Säureanhydridverfahren, das DCC-Ver-

fahren, das Aktivesterverfahren, das d s Woodward-Reagens K-Verfahrens, das Carbodiimidazolverfahren, das Oxidations-reduktionsverfahren und andere [vgl. The Peptides Band 1 (1966), Schröder und Lubke, Academic Press, New York, USA].

Vor der Kondensation können die Carboxyl- und Aminogruppen, welche an der beabsichtigten Reaktion nicht teilnehmen sollen, geschützt werden oder die an der Reaktion teilnehmenden Carboxyl- und/oder Aminogruppen nach an sich bekannten Verfahren aktiviert werden. Die Carboxylgruppen in den Ausgangsstoffen können in Form von Metallsalzen (z.B. Natrium- und Kaliumsalzen) oder von Estern (wie z.B. Methyl-, Äthyl-, Benzyl-, p-Nitrobenzyl-, tert-Butyl- oder tert.-Amyl-estern) geschützt werden.

Als Schutzgruppen für die Aminogruppen in den Ausgangsmaterialien sind alle bei der Herstellung der Peptide gebräuchlichen Schutzgruppen für Aminogruppen, wie z.B. die Benzyloxycarbonyl-, tert-Butoxycarbonyl-, Isobornyloxycarbonylgruppen geeignet. Die Iminogruppe des Histidins kann durch jede herkömmliche Schutzgruppe wie z.B. die Benzyl-, Tosyl-, 2,4-Dinitrophenol-, tert-Butoxycarbonyl- oder Carbobenzoxygruppe geschützt werden. Die Hydroxylgruppe des Serins kann durch jede herkömmliche Schutzgruppe wie z.B. die Benzyl-, tert.-Butylgruppe und andere ätherbildende Gruppen geschützt werden. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins kann mit der Benzyl-, tert.-Butyl- und anderen ätherbildenden Gruppen, die Guanidino- gruppe des Arginins mit Gruppen wie z.B. die Nitro-, Tosyl-, Carbobenzoxy-, Isobornyloxycarbonyl- oder Adamantyloxycarbonylgruppe geschützt werden. Als Beispiele für aktivierte Carboxylgruppen in den Ausgangsmaterialien seien das entsprechende Säureanhydrid, Azid oder aktive Ester [d.h. Ester mit Alkoholen wie z.B. Pentachlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol, 2,4-Dinitrophenol, Cyanomethylalkohol, p-Nitrophenol, N-Hydroxy-



- 8 -

5-norbornen-2,3-dicarboximid, N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid oder N-Hydroxybenztriaz 17, genannt. Die aktivierten Aminogruppen in den Ausgangsmaterialien können z.B. das entsprechende Phosphorsäureamid sein.

Aus der nachstehenden Tabelle sind Beispiele für Kombinationen solcher Formen von Carboxyl- und Aminogruppen in den Produkten (A) und (B) ersichtlich.

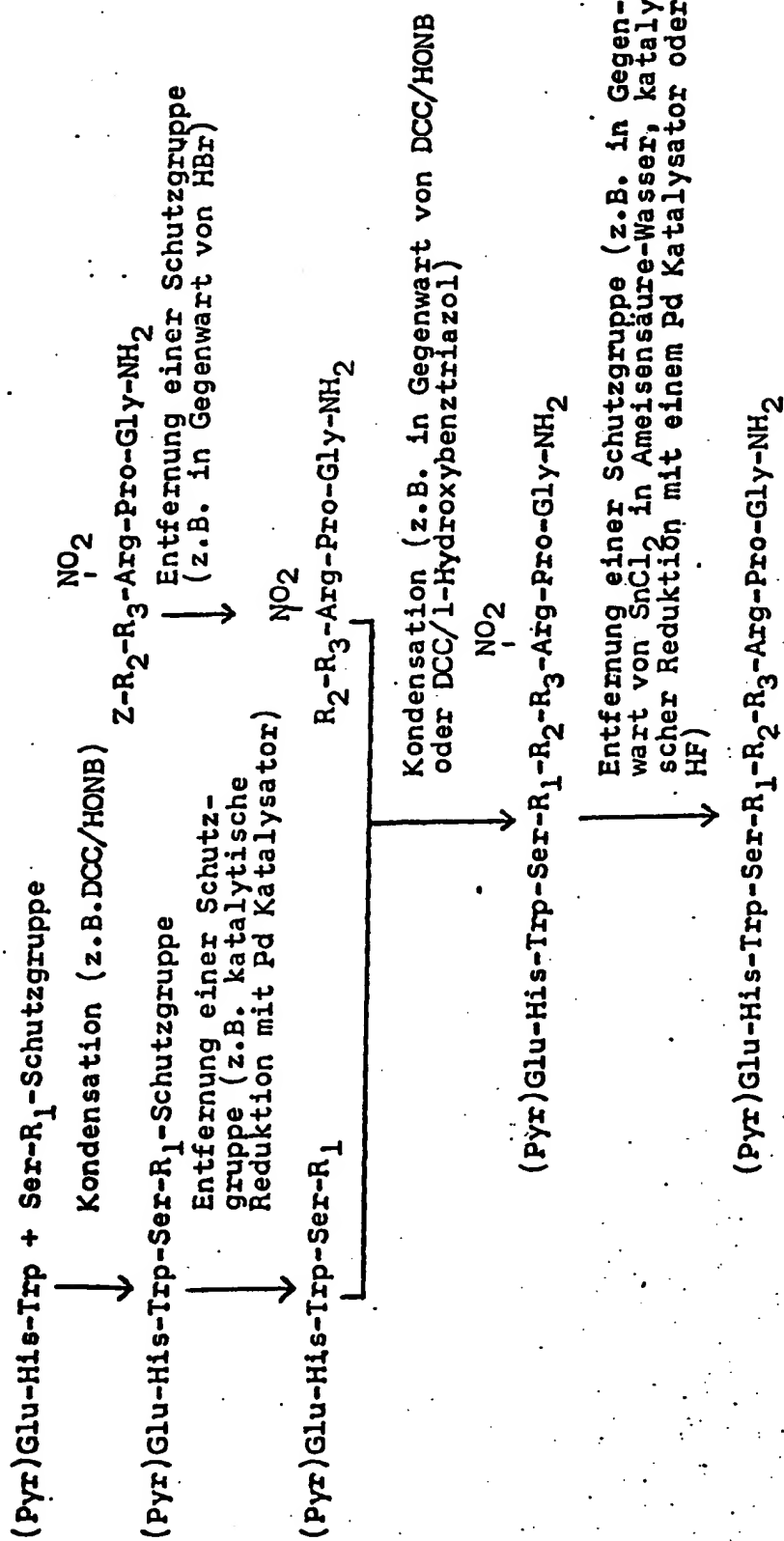
Tabelle 2

Beispiele für Kombinationen	Ausgangsmaterialien			
	(A)		(B)	
	COOH	NH <sub>2</sub>	COOH	NH <sub>2</sub>
1 <sup>+</sup>	frei	geschützt	geschützt	frei
2	aktiviert	geschützt	frei	frei
3	frei	geschützt	geschützt	aktiviert

Anmerkung: In dem mit <sup>+</sup> bezeichneten Fall liegt im Reaktionssystem vorzugsweise ein Dehydratisierungsmittel wie z.B. ein Carbodiimid wie Dicyclohexylcarbodiimid vor. Eine Ausführungsform der Erfindung ist im nachstehenden Reaktionsschema dargestellt.

- 8 -

509837/0963



- 10 -

Dies Reaktion kann in Gegenwart eines Lösungsmittels durchgeführt werden. Das Lösungsmittel kann das gleiche sein wie bei Peptidkondensationsreaktionen verwendet wird, z.B. können wasserfreies oder wässriges Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Pyridin, Chloroform, Dioxan, Dichlormethan, Tetrahydrofuran sowie geeignete Mischungen solcher Lösungsmittel als Beispiele angeführt werden.

Die Reaktionstemperatur liegt innerhalb eines Bereichs, welcher als für Reaktionen zur Peptidbindungsbildung geeignet bekannt ist, d.h. gewöhnlich innerhalb eines Bereichs von etwa -20 bis etwa 30°C. Die Precursorprodukte (die geschützten Peptide) der herzustellenden erfindungsgemäßen Verbindungen können leicht nach dem Festphasesyntheseverfahren hergestellt werden.

Nach Beendigung der Kondensationsreaktion können die gegebenenfalls vorhandenen Schutzgruppen nach bekannten Verfahren entfernt werden. Als Beispiele hierfür seien katalytische Reduktion in Gegenwart eines Katalysators wie Palladiumschwarz, Palladium auf Kohle, Platin od.dgl., Solvolyse mittels Fluorwasserstoff, Trifluoressigsäure od.dgl., und Reduktion mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak genannt.

Das so hergestellte Peptid der Formel (I) kann aus dem Reaktionsgemisch nach an sich für die Gewinnung von Peptiden bekannten Verfahren wie z.B. Extraktion, Verteilung, Säulenchromatographie u.dgl. gewonnen werden.

Die erfindungsgemäße Reaktion kann nach jedem an sich bekannten herkömmlichen Festphasesyntheseverfahren durchgeführt werden.

Das Peptid der Formel (I) kann auch in Form eines Salzes oder einer Metall-Komplexverbindung gewonnen werden.

- 10 -

509837/0963

11.  
Als Säuren, die mit den Peptiden der Formel (I) Salz bilden, seien anorganische Säuren wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Perchlorsäure, Salpetersäure, Rhodanwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure u.dgl. und organische Säuren wie Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Glycolsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Oxalsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Anthranylsäure, Zimtsäure, Naphthalinsulfonsäure oder Sulfanylsäure genannt.

Beispiele für Metalle, die mit den Peptiden der Formel (I) Metall-Komplexverbindungen bilden können, sind wie oben Zink, Nickel, Kobalt, Kupfer und Eisen. Derartige Metall-Komplexverbindungen können nach herkömmlichen Verfahren wie z.B. Umsetzen des Peptides der Formel (I) mit dem Hydroxid oder Oxid eines der vorstehend angeführten Metalle bei einem pH-Wert von etwa 6 bis 8 hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide der Formel (I) besitzen LH-RH-Wirkung (d.h., sie setzen ein luteinisierendes Hormon frei) und fördern daher die Sekretion von luteinisierendem Hormon (LH) und follikelstimulierendem Hormon (FSH). Die Polypeptide der Formel (I) sind daher für die Verwendung zur Förderung der Ovulation bei Frauen und Tieren wie z.B. Ratten, Schafen, Schweinen, Kühen, Stuten, Wachteln oder Hühnern geeignet, sie können auch für andere pharmazeutische Zwecke, für welche bisher herkömmliche LH-RH, LH und FSH-Präparate eingesetzt worden sind, verwendet werden.

Da die LH-RH-Wirkung der Polypeptide der Formel (I) etwa 10 bis 25 mal stärker ist als die LH-RH-Wirkung der in der Natur vorkommenden Verbindungen, kann ihre Dosierungsmenge für jede Anwendung auf der Basis dieses Vielfachen ermittelt werden, wobei auch andere Faktoren (wie z.B. der Empfänger der

Verabreichung oder die Art der Krankheit) in Betracht zu ziehen sind. So kann z.B. eine geeignete Dosierungsmenge innerhalb eines Bereiches von etwa 5 ng (Nanogramm) bis 10 µg täglich pro Kilogramm Körpergewicht liegen.

Polypeptide der Formel (I) werden vorwiegend nicht-peroral, d.h. mittels Injektion, rektal oder vaginal verabreicht, obgleich sie in manchen Fällen auch peroral verabreicht werden.

Als Beispiele für geeignete Darreichungsformen seien Injektionen, Suppositorien, Pessarien und Pulver genannt. Die Injektionen können durch Lösen von etwa 10 - 500 γ eines Polypeptides der Formel (I) in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung hergestellt werden. Die Polypeptide der Formel (I) können auch durch Zugabe von Mannitol als Excipienten in lyophilisierte Ampullenprodukte übergeführt werden und sind in dieser Form jederzeit als Injektionen gebrauchsfertig.

Die als Ausgangsmaterialien im erfindungsgemäßen Verfahren geeigneten Peptide können u.a. nach für die Peptidherstellung bekannten Verfahren hergestellt werden.

Die Erfindung wird anhand der nachstehend angeführten Beispiele näher erläutert.

In den Beispielen bedeuten folgende Abkürzungen den Rf-Wert bei Dünnschichtchromatographie an Silikagel mit den folgenden Lösungsmittelsystemen:

Rf<sup>1</sup>: Chloroform/Methanol/Essigsäure 9:1:0,5

Rf<sup>2</sup>: Äthylacetat/Pyridin/Essigsäure/Wasser 30:10:3:5

Rf<sup>3</sup>: n-Butanol/Äthylacetat/Essigsäure/Wasser 1:1:1:1

- 13.

Beispiel 1

Herstellung von (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-(D)-Nva-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

a) Herstellung von Z-(D)-Nva-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Einer Lösung von Z-(D)-Nva-OH (380 mg), H-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (690 mg) und HONB (300 mg) in 5 ml Dimethylformamid werden 340 mg DCC bei 0°C unter Rühren zugegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden lang bei 0°C und weitere 10 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird abfiltriert, um den entstandenen Dicyclohexylharnstoff zu entfernen, das Filtrat wird zur Trockne eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wird in 100 ml Chloroform gelöst und die Lösung mit einer 4 %-igen wässrigen Natriumbicarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die gewaschene Lösung wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird mit einem Gemisch aus Äthylacetat (25 ml) und Äther (25 ml) digeriert, man erhält ein weißes Pulver, das abfiltriert und aus Äthanol-Äther nochmals ausgefällt wird. Die Ausbeute beträgt 1,12 g,  $[\alpha]_D^{23} -50,5^{\circ}$  (c=1,1 in Methanol),  $R_f^1 = 0,32$ .

Analyse für C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub>

berechnet	C, 53,32; H, 7,27; N, 19,43
gefunden	C, 53,49; H, 7,56; N, 19,19

b) Herstellung von (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-(D)-Nva-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Z-(D)-Nva-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (1,0 g) wird in 10 ml 25 %igem Bromwasserstoff in Essigsäure gelöst und die Lösung 50 Minuten lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 200 ml trockenem Äther verdünnt, um einen Niederschlag zu erhalten, dieser wird abfiltriert und gut mit trockenem Äther gewaschen. Das gesammelte Pulver wird über Natriumhydroxid bei vermin-

dertem Druck getrocknet. <sup>Mr.</sup> Dieses Pulver wird in 10 ml Dimethyl-  
 formamid zusammen mit (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Phe-OH(1,0 g) und  
 HONB (440 mg) gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und  
 unter Rühren mit 400 mg DCC versetzt. Das Gemisch wird 6 Stun-  
 den lang bei 0°C und weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur  
 gerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch filtriert, um den  
 entstandenen Dicyclohexylharnstoff zu entfernen, das Filtrat  
 wird unter Zugabe von 100 ml Äther digeriert, um einen Nieder-  
 schlag zu erhalten, welcher abfiltriert wird. Der gesammelte  
 Niederschlag wird in 10 %-igem wässerigem Äthanol gelöst und  
 die Lösung über eine mit Polystyrolharz [Amberlite XAD-2,  
 150 - 250 Mesh, 3,5 x 25 cm, Rohm & Hass Co, Ltd. USA] ge-  
 füllte Kolonne geleitet. Die Kolonne wird nach dem Gradienten-  
 elutionsverfahren mit 10 %igem wässerigem Äthanol und 100 %igem  
 Äthanol (500 : 550 ml) eluiert. Die Hauptfraktion (380 -  
 520 ml) wird gesammelt und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand  
 wird in 5 ml heißem Methanol gelöst und durch Zugabe von  
 Äthylacetat nochmals ausgefällt, um das geschützte Decapeptid-  
 amid zu erhalten. 1,41 g,  $[\alpha]_D^{24} -35,4^\circ$  (c=0,12, in Methanol),  
 $Rf^2=0,20$ ,  $Rf^3=0,56$ .

Das geschützte Decapeptidamid (500 mg) wird in 5 ml  
 wasserfreiem Fluorwasserstoff zusammen mit 0,5 ml Anisol bei  
 -70°C gelöst. Nach 30 Minuten langem Rühren bei -5°C wird der  
 Fluorwasserstoff abgedampft. Der entstandene Rückstand wird  
 in 20 ml Wasser gelöst und die Lösung zweimal mit 10 ml  
 Äthylacetat extrahiert. Die wässrige Schicht wird über eine  
 mit Carboxymethylcellulose (2 x 33 cm) gefüllte Kolonne ge-  
 leitet, die Kolonne wird nach dem Gradientenelutionsverfahren  
 unter Einsatz eines Ammoniumacetatpuffers als Eluens eluiert.  
 [0,005M, pH 6,8(500 ml) ---- 0,2M, pH 6,8(500 ml)]. Die  
 Hauptfraktion wird gesammelt (420 - 680 ml) und lyophilisiert,  
 wobei ein weißes Pulver erhalten wird. Die Ausbeute beträgt  
 380 mg,  $[\alpha]_D^{22} -32,4^\circ$  (c=0,52, in 5 %-iger Essigsäure,  $Rf^2=$   
 $0,05$ ,  $Rf^3=0,68$ .

- 15 -

Aminosäureanalyse: His 1,01; Arg 0,98; Trp 0,87; Ser 0,94; Glu 1,00; Pro 1,02; Gly 1,00; Nva 1,01; Leu 1,00; Phe 0,97 (Peptidgehalt 84 %).

### Beispiel 2

Herstellung von (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-(D)-Nle-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> nach dem Festphaseverfahren

#### a) Herstellung von BOC-Gly-harz

In 60 ml Chloroform-Äthanol (2:1) werden 10 g Chlormethylharz eingebracht, (Cl-Gehalt 2,0mMol/g) darauf folgt die Zugabe von 10,5 g BOC-Gly und 8,4 ml Triäthylamin. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur 1,5 Stunden gerührt und dann 24 Stunden lang erhitzt. Das Harz wird abfiltriert und gut mit Dimethylformamid, dann mit Äthanol, Wasser, Äthanol und Äther in angegebener Reihenfolge gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute beträgt 17,55 g. Die Aminosäureanalyse zeigt, daß dieses Harz 0,88 mMol/g BOC-Gly enthält.

#### b) Herstellung des (Pyr)Glu-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr-(Bzl)-D-Nle-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-harzes

In das Reaktionsgefäß einer automatischen Peptidherstellungsvorrichtung (Modell APS-800 von Simadzu Seisakusho K.K., Japan) werden 2,177 g BOC-Gly-Harz, das wie oben angeführt hergestellt wurde, eingebracht und mit Dichlormethan 12 Stunden lang angequollen. Dann werden folgende Aminosäuren nach dem unten angeführten Schema eingebracht:

BOC-Pro, BOC-Arg(Tos), BOC-Leu, BOC-D-Nle, BOC-Tyr(Bzl), BOC-Ser(Bzl), BOC-Trp, BOC-His(Tos), (Pyr)Glu.

Dichlormethan (3 Minuten x 3), → 50 % Trifluoressigsäure/Dichlormethan (10 bzw. 30 Minuten), → Dichlormethan (3 Minuten x 3), → Äthanol (3 Minuten x 3), → Dichlormethan (3 Minuten x 3) → 10 % Triäthylamin/Chloroform (10 Minuten) →



Chloroform (3 Minuten x 3) <sup>16-</sup> → Dichlormethan (3 Minuten x 2) → BOC-Aminosäureanhydrid (hergestellt aus BOC-Aminosäure und DCC nach einem bekannten Verfahren) (30 und 60 Minuten) → Acetylierung (mit Säureanhydrid in Dichlormethan und Triäthylamin) (1 Stunde) → Dichlormethan (3 Minuten x 3) [nur (Pyr) Glu wird direkt mit DCC in Dimethylformamid kondensiert].

Das Harz wird mit Äthanol, Chloroform und Dimethylformamid, dann mit Äther gewaschen und getrocknet, die Ausbeute beträgt 6,20 g.

c) Herstellung von (Pyr)Glu-His(Tos)-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-D-Leu-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

In 50 ml mit Ammoniak gesättigtem Methanol werden 2,622 g des nach b) hergestellten Harzes suspendiert, die Suspension wird bei Raumtemperatur 70 Stunden lang gerührt.

Das Harz wird abfiltriert und mit Dimethylformamid gewaschen. Das Filtrat und die Waschwässer werden zusammengegeben, bei vermindertem Druck zur Trockne eingeengt und mit Äther behandelt. Nach diesem Verfahren erhält man 1,187 g rohes Pulver.

588 mg dieses Produktes werden in einer trockenen Säule an 50 g Silikagel gereinigt, als Entwicklerflüssigkeit wird ein Lösungsmittelsystem aus Methanol und Chloroform verwendet. Man erhält 186 mg des gewünschten Produktes.

d) Herstellung von (Pyr)Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

In Gegenwart von 0,2 ml Anisol und 0,2 ml Mercaptoäthanol werden 173,3 mg des nach c) hergestellten, geschützten Peptides in 5 ml trockenem Fluorwasserstoff gelöst, die Lösung wird bei

14.  
 0°C 1 Stunde lang gerührt. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wird sie bei vermindertem Druck zur Trockne eingeengt und das Konzentrat in 20 ml Wasser gelöst. Die unlöslichen Stoffe werden abfiltriert und das Filtrat über eine Kolonne (1,5 cm Durchmesser x 20 cm) eines stark basischen Anionenaustauscherharzes (Amberlite IRA-410 Acetat-Form, Rohm & Haas Co. Ltd. USA) geleitet. Die vorgereinigten Effluente werden anschließend mittels Carboxymethylcellulose (1,5 x 22 cm; nach dem Gradientenelutionsverfahren unter Einsatz von 0,005 M bis 0,2 M Ammoniumacetat mit einem pH-Wert von 6,8) und hierauf über Polystyrolharz (Amberlite XAD-2, Rohm & Haas Co. Ltd. USA) (1,5 x 7,5 cm, nach dem Gradientenelutionsverfahren unter Verwendung von 5 - 70 %-igem wässrigem Äthanol) gereinigt. Das Eluat wird der Gelfiltrationschromatographie an Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Schweden) (0,9 x 53,5 cm, 0,1 N Essigsäure) unterworfen. Man erhält 39 mg der gewünschten Verbindung.  $[\alpha]_D^{24} -40,5^\circ$  (c=0,5 in 5%-iger wässriger Essigsäure)

Aminosäureanalyse (Säurehydrolyse in Gegenwart von Thioglycol-säure): Glu 0,97; His 0,97; Trp 0,94; Ser 0,88; Tyr 1,0; Leu 1,00; Nle 1,06; Arg 1,03; Pro 1,00; Gly 1,03 (87 % Ausbeute)

### Beispiele 3 - 13

In der nachstehenden Tabelle sind Decapeptidamide der Formel (I) angeführt, welche nach einem in Beispiel 2 angeführten ähnlichen Verfahren, jedoch unter Einsatz der in der Tabelle angegebenen Ausgangsmaterialien anstelle der in Beispiel 2 angeführten hergestellt wurden.

Tabelle

Beispiel	Decapeptidamide (I)			$[\alpha]_D^{24}$ (c=0,5 in 5 %-iger wässriger Essigsäure	Aminosäureanalyse	Ausgangsmaterialien die anstelle der in Beispiel 2 angeführten eingesetzt wurden		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu
3	Tyr	D-Ser	Leu	-44.8°	His 1.02; Arg 1.01; Trp 0.97; Ser 1.91; Glu 1.00; Pro 1.01; Gly 1.03; Leu 0.97; Tyr 0.96	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Ser (Bzl)	BOC-Leu
4	Tyr	D-Abu	Leu	-43.2°	His 0.96; Arg 1.00; Trp 0.89; Ser 0.92; Glu 1.00; Pro 1.00; Gly 0.99; Abu 0.97; Leu 1.00; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Abu	BOC-Leu
5	Tyr	D-Nva	Leu	-38.9°	His 1.00; Arg 0.99; Trp 0.92; Ser 0.91; Glu 1.00; Pro 1.00; Gly 1.01; Nva 0.97; Leu 0.98; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nva	BOC-Leu
6	Tyr	D-Thr	Leu	-37.5°	His 1.01; Arg 0.98; Trp 0.95; Thr 1.00; Ser 0.92; Glu 1.00; Pro 1.00; Gly 0.99; Leu 1.00; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Thr	BOC-Leu

509837/0963

Tabelle

Beispiel	Decapeptidamide (I)			$[\alpha]_D^{24}$ (c=0.5 in 5 %-iger wässriger Essigsäure	Aminosäureanalyse	Ausgangsmaterialien die anstelle der in Beispiel 2 angeführten eingesetzt wurden		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu
7	Tyr	D-Phe	Leu	-52.4°	His 1.00; Arg 0.99; Trp 0.87; Ser 0.89; Glu 1.00; Pro 0.99; Gly 1.01; Leu 0.98; Phe 1.00; Tyr 0.96	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Phe	BOC-Leu
8	Tyr	D-Met	Leu	-42.0°	His 0.98; Arg 1.00; Trp 0.89; Ser 0.92; Glu 0.99; Pro 0.98; Gly 1.00; Met 0.79; Leu 1.00; Tyr 1.00	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Met	BOC-Leu
9	Phe	D-Phe	Leu	-69.5°	His 1.00; Arg 0.98; Trp 0.87; Ser 0.98; Glu 1.01; Pro 0.98; Gly 1.00; Leu 1.00; Phe 1.98	BOC-Phe	BOC-D-Phe	BOC-Leu
10	Tyr	D-Abu	Ile	-38.5°	His 1.00; Arg 1.00; Trp 0.92; Ser 0.88; Glu 1.03; Pro 1.00; Gly 1.00; Abu 0.96; Ile 0.98; Tyr 0.98	BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Abu	BOC-Ile

509837/0963

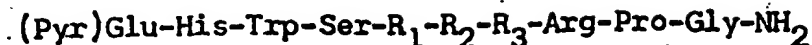
ORIGINAL INSPECTED

Tabelle

Beispiel	Decapeptidamide (I)			$[\alpha]_D^{24}$ (c=0,5 in 5 %-iger wässriger Essigsäure	Aminosäureanalyse	Ausgangsmaterialien die anstelle der in Beispiel 2 angeführten eingesetzt wurden		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			BOC-Tyr(Bzl)	BOC-D-Nle	BOC-Leu
11	Phe	D-Ser	Nle	-32.5°	His 0.96; Arg 0.94; Trp 0.87; Ser 1.87; Glu 1.00; Pro 0.99; Gly 1.00; Nle 0.96; Phe 1.02	BOC-Phe	BOC-D-Ser (Bzl)	BOC-Nle
12	Phe	D-Nle	Nle	-35.1°	His 1.00; Arg 1.01; Trp 0.81; Ser 0.89; Glu 1.02; Pro 1.00; Gly 1.00; Nle 2.03; Phe 0.97	BOC-Phe	BOC-D-Nle	BOC-Nle
13	Phe	D-Nva	Ile	-35.5°	His 0.96; Arg 1.00; Trp 0.86; Ser 0.89; Glu 1.00; Pro 1.00; Gly 0.98; Nva 0.90; Ile 0.92; Phe 0.99	BOC-Phe	BOC-D-Nva	BOC-Ile

. 21 .  
P a t e n t a n s p r ü c h e :

## 1. Verbindung der Form 1



worin  $R_1$  Tyr oder Phe,  $R_2$  D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr oder D-Met und  $R_3$  Leu, Ile oder Nle bedeuten.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  für Tyr,  $R_2$  für D-Nle und  $R_3$  für Leu stehen.

3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Tyr,  $R_2$  D-Ser und  $R_3$  Leu bedeuten.

4. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Tyr,  $R_2$  D-Abu und  $R_3$  Leu bedeuten.

5. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Tyr,  $R_2$  D-Nva und  $R_3$  Leu bedeuten.

6. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Tyr,  $R_2$  D-Thr und  $R_3$  Leu bedeuten.

7. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Tyr,  $R_2$  D-Phe und  $R_3$  Leu bedeuten.

8. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Tyr,  $R_2$  D-Met und  $R_3$  Leu bedeuten.

9. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Phe,  $R_2$  D-Phe und  $R_3$  Leu bedeuten.

10. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Tyr,  $R_2$  D-Abu und  $R_3$  Ile bedeuten.

-29-

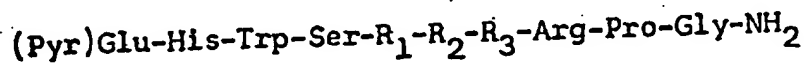
11. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Phe,  $R_2$  D-Ser und  $R_3$  Nle bedeuten.

12. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Phe,  $R_2$  D-Nle und  $R_3$  Nle bedeuten.

13. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Phe,  $R_2$  D-Nva und  $R_3$  Ile bedeuten.

14. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_1$  Phe,  $R_2$  D-Nva und  $R_3$  Leu bedeuten.

15. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel



worin  $R_1$  Tyr oder Phe,  $R_2$  D-Nle, D-Nva, D-Abu, D-Phe, D-Ser, D-Thr oder D-Met und  $R_3$  Leu, Ile oder Nle bedeuten, dadurch gekennzeichnet, daß ein Reaktant (A) ---- L-Pyroglutaminsäure oder ein Peptidfragment mit einer N-endständigen L-Pyroglutaminsäureeinheit (wie z.B. (Pyr)Glu-), welches von dort an die oben angeführte Aminosäuresequenz aufweist, ---- mit einem Reaktanten (B) --- einer Aminosäurekomponente, die dem Rest des oben angeführten Decapeptidamidderivates entspricht, --- kondensiert wird, wobei die Reaktanten (A) und (B) gegebenenfalls geschützt sind und die Schutzgruppen gegebenenfalls entfernt werden.